

MAYRA MARA FERRARI BARBOSA

**ESTABELECIMENTO DE UMA NOVA PLATAFORMA DE  
APRESENTAÇÃO DE ANTÍGENOS *MULTIPLE ANTIGEN  
PRESENTING SYSTEM* (MAPS) APLICADOS A ANTÍGENOS  
VACINAIS DE *SCHISTOSOMA MANSONI***

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação  
Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto  
Butantan/IPT, para obtenção do título de doutor em  
Biotecnologia

São Paulo  
2019

MAYRA MARA FERRARI BARBOSA

**ESTABELECIMENTO DE UMA NOVA PLATAFORMA DE  
APRESENTAÇÃO DE ANTÍGENOS *MULTIPLE ANTIGEN  
PRESENTING SYSTEM* (MAPS) APLICADOS A ANTÍGENOS  
VACINAIS DE *SCHISTOSOMA MANSONI***

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação  
Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT,  
para obtenção do título de doutora em Biotecnologia

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Biotecnologia

ORIENTADORA: Luciana Cézár de Cerqueira Leite

São Paulo - SP, Brasil

Versão Original

São Paulo  
2019

## RESUMO

**BARBOSA, M. M. F.** Estabelecimento de uma nova plataforma de apresentação de antígenos *Multiple antigen presenting system* (MAPS) aplicada a antígenos vacinais de *Schistosoma mansoni*. 2019, 90 páginas, Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A esquistossomose é uma das mais importantes doenças parasitárias em termos de morbidade e mortalidade. Nos últimos anos, as pesquisas por vacinas foram impulsionadas por avanços em estudos de proteômica e transcriptômica do *S. mansoni*, identificando genes/proteínas como potenciais candidatos vacinais contra a esquistossomose. Entretanto, os estudos desenvolvidos até o momento indicam a necessidade de aumentar a imunogenicidade desses antígenos. O objetivo deste trabalho foi estabelecer e investigar um novo sistema de apresentação de múltiplos antígenos (MAPS). Este sistema se baseia numa abordagem de acoplamento à base de afinidade, expressando os antígenos-alvo em fusão com a proteína de ligação à biotina, Rhizavidina (Rhavi). Neste caso, utilizamos como matriz vesículas de membrana externa (OMV) obtidas a partir de *Neisseria lactamica*. Inicialmente, foram construídos os vetores de expressão de sete antígenos. Foram avaliadas diferentes cepas de *E. coli* e meios de cultura, selecionando *E. coli* BL21-DE3 e *Terrific broth* para a realização de desenhos experimentais estatisticamente planejados. Foram estabelecidos as condições de cultivo com maior rendimento de expressão dos antígenos SmTSP-2 e SmCD59.2, utilizados como prova do princípio. As proteínas recombinantes solúveis foram obtidas em concentrações elevadas, purificadas por cromatografia de afinidade e detoxificadas para eliminação do LPS. Em paralelo, as OMVs foram obtidas a partir dos cultivos de *N. lactamica*, detoxificadas e conjugadas com biotina. Os complexos MAPS-OMV-SmTSP-2 e MAPS-OMV-SmCD59.2 foram obtidos por acoplamento, purificados por cromatografia de gel filtração e caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão. Os ensaios *in vitro* com células dendríticas derivadas da medula óssea de camundongos C57Bl/6 e com monócitos e macrófagos humanos demonstraram que os MAPS induziram um perfil de citocinas inflamatórias mais elevado que as proteínas recombinantes. Ensaio *in vivo* com o complexo MAPS-OMV-SmTSP-2 mostraram uma elevada produção de anticorpos IgG específicos contra o antígeno SmTSP-2, com perfil de isotipos IgG1/IgG2c indicando capacidade balanceada de ativação dos dois braços da resposta imune Th1 e Th2. Os ensaios preliminares indicam o elevado poder adjuvante dos complexos MAPS-OMV-SmAg.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*, vacina de esquistossomose, apresentação de antígenos, OMV (*outer membrane vesicles*)

## ABSTRACT

**BARBOSA, M. M. F.** Establishment of a new Multiple Antigen Presenting System (MAPS) platform applied to *Schistosoma mansoni* vaccine antigens. 2019, 90 pages, Thesis (Doctorate in Biotechnology) - Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2019.

Schistosomiasis is one of the most important parasitic diseases in terms of morbidity and mortality. In recent years, vaccine research has been driven by advances in proteomic and transcriptomic studies of *S. mansoni*, identifying genes / proteins as potential vaccine candidates against schistosomiasis. However, studies conducted so far indicate the need to increase the immunogenicity of these antigens. The objective of this work was to establish and investigate a novel multiple antigen presentation system (MAPS). This system is based on an affinity-based coupling approach combining the target antigens fused to the biotin-binding protein Rhizavidine (Rhavi), to a biotinilated scaffold. In this case, we used as scaffold outer membrane vesicles (OMV) obtained from *Neisseria lactamica*. Initially, the expression vectors of seven antigens were constructed. Different strains of *E. coli* and culture media were evaluated, selecting *E. coli* BL21-DE3 and Terrific broth to perform Design of Experiments. The culture conditions with higher yield of expression of the antigens SmTSP-2 and SmCD59.2 were established and used as proof of the principle. Soluble recombinant proteins were obtained at high concentrations, purified by affinity chromatography and detoxified for elimination of LPS. In parallel, OMVs were obtained from *N. lactamica* cultures, detoxified and conjugated with biotin. The MAPS-OMV-SmTSP-2 and MAPS-OMV-SmCD59.2 complexes were obtained by coupling, purified by gel filtration chromatography and characterized by transmission electron microscopy. *In vitro* assays with bone marrow derived dendritic cells from C57Bl/6 mice and with human monocytes and macrophages showed that MAPS induced a higher inflammatory cytokine profile than recombinant proteins. *In vivo* assays with the MAPS-OMV-SmTSP-2 complex showed high production of SmTSP-2 specific IgG antibodies, with IgG1 / IgG2c isotype profile indicating a balanced capacity for activation of both arms of the Th1 and Th2 immune response. Preliminary assays indicate the high adjuvant power of MAPS-OMV-SmAg complexes.

Keywords: *Schistosoma mansoni*, schistosomiasis vaccine, antigen presentation, OMV (outer membrane vesicles).

## 1. INTRODUÇÃO

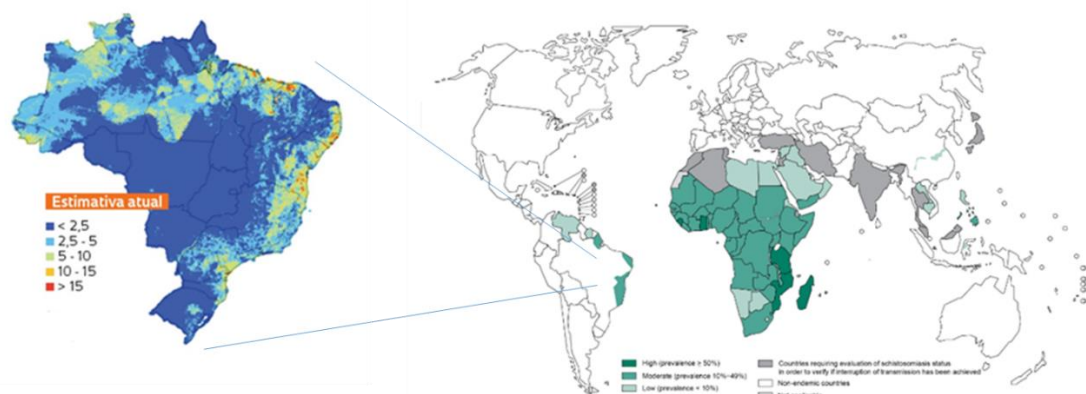
### 1.1. A esquistossomose e seu impacto no mundo

A esquistossomose é uma doença crônica causada por parasitas do gênero *Schistosoma*, no qual existem as seguintes espécies capazes de infectar o ser humano *Schistosoma mansoni*, *S. japonicum*, *S. mekongi*, *S. intercalatum* e *S. haematobium*. Essa doença parasitária é de grande impacto mundial, sendo considerada a doença helmíntica de maior importância em termos de morbidade e mortalidade. Endêmica em 78 países, já afeta quase 240 milhões de indivíduos em todo o mundo, 120 milhões são sintomáticos, 20 milhões sofrem de doenças graves e mais de 800 milhões vivem em áreas endêmicas (Figura 1). O número total de indivíduos que necessitaram de quimioterapia preventiva globalmente em 2015 foi de 218,8 milhões, dos quais 118,5 milhões eram crianças em idade escolar. A infecção prevalece em áreas tropicais e subtropicais, em comunidades pobres sem água potável e saneamento adequado (Boros 1989, McManus and Loukas 2008, El Ridi and Tallima 2015, WHO 2016).

No Brasil as regiões endêmicas da doença encontram-se espalhadas em toda região litorânea do Nordeste e no interior da Bahia, atingindo também partes do Sudeste, em especial Minas Gerais (Amaral, Tauil et al. 2006). Segundo o Ministério da Saúde, desde o ano 2000 foram reportados aproximadamente 1,3 milhões de casos no Brasil até 2016. Admite-se existirem mais de seis milhões de indivíduos infectados e estima-se que já foram tratados no país mais de 12 milhões de casos (Amaral, Tauil et al. 2006, Ministério-da-saúde 2016). Em uma avaliação mais aprofundada sobre o risco de contaminação dessa doença no Brasil, o biólogo Ronaldo Scholte e outros pesquisadores da Suíça mostraram que a combinação de variáveis climáticas, geográficas e socioeconômicas devidamente analisadas e interpretadas, trazem uma ampliação das áreas de risco de contaminação para esquistossomose no Brasil. A faixa litorânea continua sendo a área de maior risco, entretanto, todo o território brasileiro apresenta um determinado risco (Figura 1) (Scholte *et al.* 2014).

Por ser uma doença crônica e pouco reconhecida em seus estágios iniciais, a esquistossomose incapacita homens e mulheres nas fases mais produtivas de suas vidas, além de afetar crianças na fase de desenvolvimento cognitivo (Engels, Chitsulo et al. 2002). Em função deste cenário mundial, o Programa Especial de Treinamento em Doenças Tropicais (TDR) da ONU (Organização das Nações Unidas), Banco Mundial e OMS selecionou, desde o início da década de 1990, a esquistossomose como uma das dez doenças tropicais mais importantes para controle (Morel 2000). No ano de 2016, líderes de saúde dos países membros da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) decidiram investir em um plano de ação para

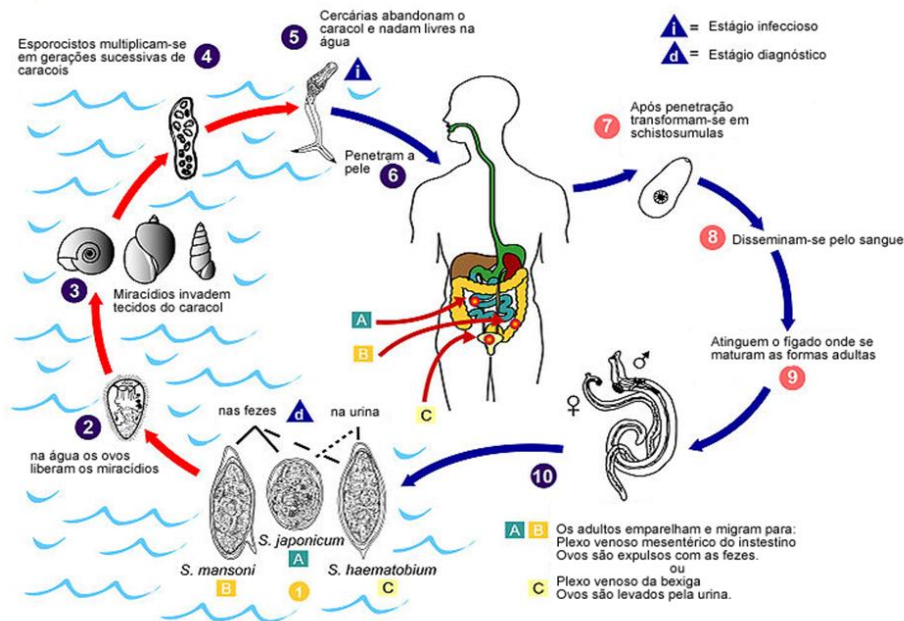
eliminar oito doenças infecciosas negligenciadas, dentre as quais, a esquistossomose continua sendo listada (OPAS 2017).



**Figura 1: Distribuição da ocorrência de casos de esquistossomose no mundo e em especial no Brasil** (Adaptado da WHO, 2016 e Scholte et al. 2014).

## 1.2. O ciclo da doença e seu controle epidemiológico

O *Schistosoma mansoni* é um trematódeo sanguíneo que vive em casais nas veias mesentéricas do hospedeiro. Seu ciclo de vida é complexo alternando entre caramujos aquáticos (hospedeiro intermediário), onde a reprodução assexuada ocorre e os seres humanos (hospedeiro definitivo), nos quais ocorre a reprodução sexuada (Boros 1989). A infecção humana é iniciada durante a exposição à água infestada por cercarias, larvas de vida livre capazes de penetrar através da pele do hospedeiro. Ao cair na corrente sanguínea, as cercarias transformam-se em esquistossômulos, migram para o pulmão e depois para o sistema porta hepático, onde se desenvolvem em vermes adultos, e após a maturação das fêmeas inicia-se a oviposição (Figura 2). Parte desses ovos são eliminados através das fezes e urina (*S. hematobium*), outra parte fica aderida a parede do sistema porta hepático, desencadeando os sintomas clássicos da doença, como dor abdominal, diarreia e sangue nas fezes. O aumento do fígado é comum em casos avançados e é frequentemente associado a um acúmulo de líquido na cavidade peritoneal e hipertensão dos vasos sanguíneos abdominais. Em tais casos, pode também haver alargamento do baço (Boros 1989, McManus and Loukas 2008, WHO 2014, WHO 2016). O ciclo de vida deste parasita fecha quando os ovos eliminados através das fezes ou urina chegam à água e após a eclosão originam-se miracídios, larvas capazes de infectar os caramujos; no caso do *Schistosoma mansoni*, estas larvas infectam caramujos do gênero *Biomphalaria*. No caramujo, os miracídios transformam-se em esporocistos, os quais originarão as cercarias através da reprodução assexuada (McManus and Loukas 2008).



**Figura 2: Ciclo de vida do Schistosoma** (Retirado de CDC 2017).

A inexistência de uma vacina profilática, capaz de prevenir a infecção ou diminuir a morbidade da patologia associada a esquistossomose, limita o controle da doença a administração de quimioterápicos como a oxamniquina (OXA) e o Praziquantel (PZQ). O PZQ possui uma alta eficácia, baixa toxicidade e baixo custo de produção, o que o torna a droga de escolha tanto em tratamentos individuais quanto nas administrações massivas de populações de áreas endêmicas (van der Werf, de Vlas et al. 2003, Ribeiro-dos-Santos, Verjovski-Almeida et al. 2006). Entretanto, a quimioterapia em massa nas regiões endêmicas é pouco efetiva, porque o PZQ não age sobre o estágio de esquistossômulos e não previne à reinfecção, dificultando a erradicação da doença e sendo necessária a repetição do tratamento de tempos em tempos (Sabah, Fletcher et al. 1986). Além disso, já foi descrita a baixa eficácia do tratamento no Egito e Senegal, onde linhagens resistentes a droga foram isoladas (Fallon, Sturrock et al. 1995, Ismail, Botros et al. 1999, Melman, Steinauer et al. 2009).

Desta forma o desenvolvimento de uma vacina contra a doença, se apresenta como a estratégia mais efetiva de controle, pela possibilidade de promover a proteção aos indivíduos em longo prazo, ao contrário da redução da carga parasitária de curto prazo, como no caso de quimioterápicos (Bergquist 2002). Além disso, frente à falta de recursos para investimentos em saúde pública e em medidas sanitárias efetivas decorrente de dificuldades políticas e econômicas, a vacinação preventiva torna-se o instrumento de melhor custo-benefício para controle da doença (Katz 1999).

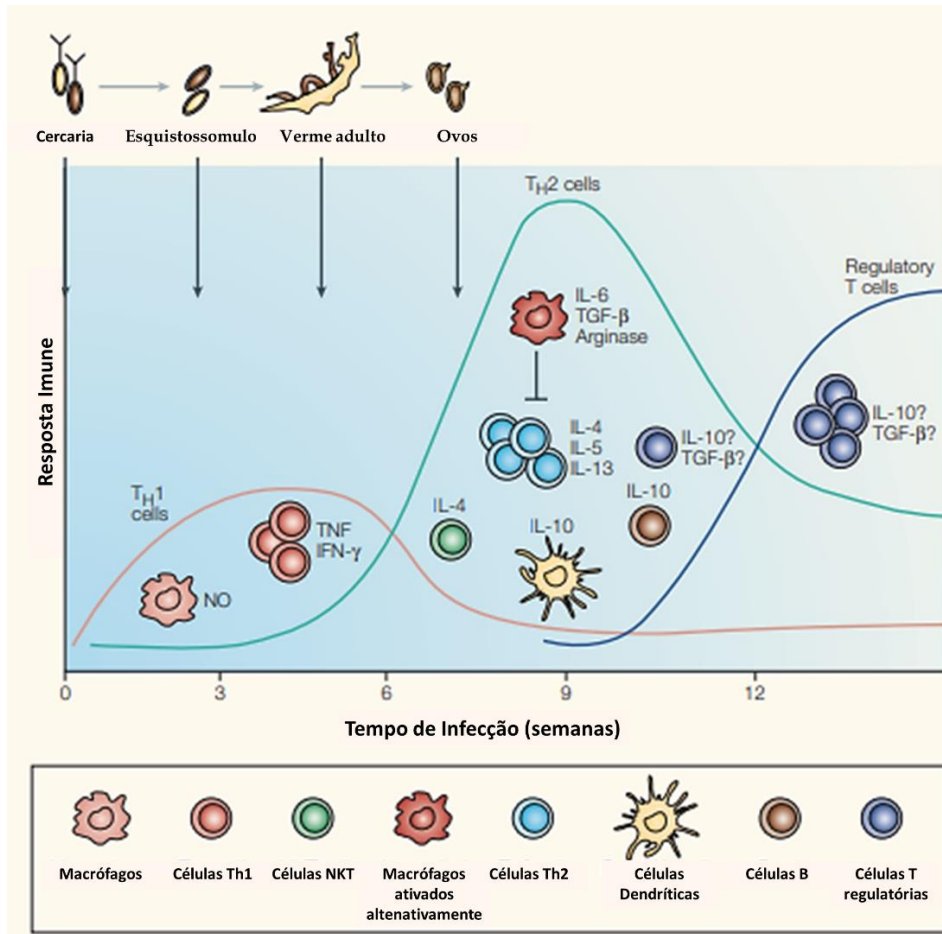
### 1.3. Resposta Imune na Esquistossomose

Dada a complexidade do ciclo de vida do *Schistosoma mansoni* no hospedeiro definitivo e seus diferentes estágios, a resposta imunológica desencadeada pelo hospedeiro na tentativa de eliminar as cercárias penetrantes, os esquistossômulos migrantes, os vermes adultos e os ovos produzidos por pares de vermes adultos também é complexa (Colley and Secor 2014). Todos esses estágios expressam centenas, se não milhares, de grupos antigênicos, muitos dos quais estimulam respostas imunes humorais e celulares fortes (Verjovski-Almeida et al. 2004). Algumas dessas respostas continuam a aumentar durante a infecção crônica, e outras são fortemente reprimidas (Colley and Secor 2014). A partir de estudos realizados em modelo murino, acredita-se que o principal foco de eliminação do parasita no hospedeiro seja o pulmão, onde respostas imunológicas efetivas conseguem eliminar esquistossômulos migrantes (Wilson et al. 1996). A resposta imune do hospedeiro contra o verme adulto é ineficiente, tendo este a capacidade de sobreviver no hospedeiro definitivo por anos (Pearce and MacDonald 2002).

Em humanos, durante o desenvolvimento da fase aguda da doença ocorre o aumento de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) que produzem grandes quantidades de fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 (IL-1) e IL-6. Notavelmente, a produção de citocinas pelos PBMCs após a estimulação com o antígeno do parasita resulta em um perfil de resposta Th1 (Células T helper 1), ao invés de Th2 (Pearce and MacDonald 2002). É observado também o aumento dos níveis de anticorpos IgG1, IgG2 e IgG3 (De Jesus et al. 2002). Presumivelmente, na progressão natural da doença a resposta Th2 é induzida por antígenos do ovo, células T natural killer (NKT) são ativadas, as células dendríticas produzem mais interleucina-10 (IL-10) e menos IL-12 e o desenvolvimento dessa resposta Th2 regula negativamente a produção e as funções efetoras de mediadores pró-inflamatórios. Se esta resposta Th2 persistir, chegamos a forma crônica da doença, mediada pela elevada produção de citocinas IL-14, IL-5 e IL-13 e com uma modificação no perfil dos anticorpos, os níveis de produção de IgG4 aumentam, enquanto os de IgG1, IgG2 e IgG3 baixam. Tal resposta, pode contribuir para o desenvolvimento da fibrose hepática e morbidade (Pearce and MacDonald 2002). Além disso, as células B1 e B2 produzem IL-10, em resposta a antígenos derivados de ovos e antígenos derivados de vermes, respectivamente. Essa alta produção de IL-10 por células dendríticas (DCs) e Células B levam ao desenvolvimento células T reguladoras. As células T regulatórias induzidas por helmintos têm o potencial de suprimir a resposta das células Th1 a antígenos derivados de helmintos, garantindo assim a polarização das células Th2. A indução de células T reguladoras por esses mecanismos pode ser uma maneira importante de controlar



respostas imunes excessivamente vigorosas durante o curso da infecção crônica por esquistossomose (Figura 3) (Dunne, DM. and Cooke A., 2005).



**Figura 3: Indução da resposta imune mediada por células T helper-1 e T-helper-2 e desenvolvimento de células T reguladoras após infecção por *Schistosoma mansoni*.** Após a infecção pelo *Schistosoma mansoni*, a resposta imune inicial que se desenvolve é uma resposta da célula T helper 1 (Th1). À medida que o verme se desenvolve e os ovos são depositados, as células T natural killer (NKT) são ativadas, as células dendríticas produzem mais IL-10 e menos IL-12, e uma resposta das células Th2 se desenvolve. Além disso, as células B1 e B2 produzem IL-10, em resposta a antígenos derivados de ovos e antígenos derivados de vermes, respectivamente. Populações de macrófagos alternativamente ativados e células T reguladoras também se desenvolvem. NO = óxido nítrico. (adaptado de Dunne, DM. and Cooke A., 2005).

#### 1.4. Desenvolvimento de vacinas contra Esquistossomose

##### 1.4.1. Justificativa para o desenvolvimento de vacinas contra esquistossomose

O desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a esquistossomose preveniria a evolução de linhagens de parasitas resistentes ao tratamento com drogas e protegeria contra a patologia associada às reinfecções. Esta forma de prevenção pode ser considerada ainda mais relevante, pois a patologia não é revertida pela quimioterapia e o diagnóstico da doença é difícil nos estágios iniciais devido à sintomatologia inespecífica (Wilson and Coulson 1999). Modelos

matemáticos indicam que a vacina não precisaria apresentar imunidade esterilizante, e que uma redução de pelo menos 40% na carga parasitária reduziria a morbidade e as taxas de transmissão significativamente (Chan and Bundy 1997).

Diversos dados apoiam a viabilidade do desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a esquistossomose: I – pessoas residentes em áreas endêmicas desenvolvem naturalmente diferentes níveis de proteção contra a infecção (Bergquist 2002); II – diversos modelos animais da esquistossomose apresentam auto cura baseada na resposta imune, como Macaco rhesus, *Macaca mulata* e *Rattus norvegicus* (Wilson and Coulson 1999) ; III – alguns modelos animais, tanto primatas quanto roedores, apresentaram altos níveis de proteção (> 90% em camundongos e 86% em primatas) quando imunizados com cercarias atenuadas por irradiação (Coulson 1997, Hewitson, Hamblin et al. 2005).

Graças a esses modelos, muito tem se investido na caracterização dessas respostas imunes protetoras, no intuito de entender o mecanismo imune da Esquistossomose (Coulson 1997, Bergquist e Colley 1998, Hewitson, Hamblin et al. 2005). Tais pesquisas mostraram que tanto os mecanismos efetores celulares quanto humorais são necessários para prevenir a migração precoce de larvas dentro de hospedeiros mamíferos (Coulson 1997, Rieckmann 1990, Eberl et al. 2001, Bickel 2009).

Como exemplo, em camundongos foi observado que durante a exposição percutânea inicial a cercarias normais ou irradiadas induzem a produção de citocinas Th1 (IFN- $\gamma$  e IL-2) e Th2 (IL-5 e IL4) em linfonodos drenantes (Caulada-Benedetti et al. 1991). Entretanto, estas respostas são mais prolongadas com a infecção por cercaria irradiada e as citocinas Th1 tendem a aumentar preferencialmente em momentos posteriores (Pemberton et al. 1991). Em paralelo, a proteção mediada por anticorpos induzida por vacinas irradiadas, está ligada a produção de anticorpos IgG em vez de anticorpos IgE, os quais estão implicados na resistência naturalmente adquirida em humanos (Bickel 2009). Em ratos, a atuação dos anticorpos IgG2a e IgG2b na proteção aparentemente se baseia em uma resposta imunológica mediada por eosinófilos, opsonização e ativação do complemento contra esquistossômulos migrantes (Horta and Ramalho-Pinto 1984).

Apesar da vacina de cercaria irradiada ser um bom modelo de estudo, sua aplicação como vacina para humanos é inviável, devido principalmente a possibilidade de o parasita recuperar sua forma infectante e aos elevados custos de produção.

As análises do processo de auto cura em *Macaco rhesus* também trouxeram conhecimentos significativos com relação ao mecanismo imune envolvido no combate a infecção pelo parasita. O estudo desenvolvido por Wilson *et al.* 2008 sugere que a morte do

parasita é mediada por inanição, ou seja, há um bloqueio na alimentação do sangue como resultado de processos mediados por anticorpos, visto que, os vermes recuperados dos macacos por perfusão portal após 18 semanas de infecção são significativamente menores, com alterações degenerativas nos intestinos e nos órgãos reprodutivos. Já em 2015, Li e colaboradores, demonstraram que o fenômeno de auto-cura em macacos *rhesus* também é observado para infecções com *S. japonicum*. Os autores propõe que o bloqueio da alimentação seja gerado por um bloqueio da função do esôfago mediado por anticorpos IgG. O IgG produzido pelos macacos *rhesus* liga-se fortemente ao lúmen esofágico e co-localiza-se completamente com cinco proteínas esofágicas secretadas, SjMEG 4.1, 8.2, 9, 11 e VAL-7. Isso levaria a obstrução do lúmen, dificultando o processamento do sangue e levando a morte do parasita por inanição.

Ao longo dos últimos 10 anos muitos esforços foram realizados no intuito de identificar os antígenos responsáveis pela ativação da resposta imune protetora tanto em modelo murino, como em humanos. Na secção seguinte serão descritos os que apresentaram resultados mais promissores. Vale ressaltar que, um dos grandes desafios nos estudos desses antígenos está na expressão e formulação dos mesmos, bem como no desenvolvimento de um bom sistema de apresentação de antígenos (McManus and Loukas 2008).

#### *1.4.2. Antígenos vacinais em ensaios clínicos*

Atualmente, apenas três antígenos vacinais de *Schistosoma* seguiram para testes clínicos em humanos. O primeiro deles advém de *S. haematobium*, a glutathione S-transferase recombinante (Sh28GST), a qual é formulada com hidróxido de alumínio como adjuvante e recebe o nome de Bilhvax. Nos estudos pré-clínicos, a vacina inibiu significativamente a fecundidade das fêmeas e a viabilidade do ovo. Com isso, a vacina foi conduzida para ensaios clínicos em 1998 (Ricciardi and Ndao 2015, Tebeje, Harvie et al. 2016). Em 2018, o resultado do ensaio clínico de fase 3 realizado no Senegal mostrou que, em crianças entre 6 e 9 anos infectadas e tratadas com Praziquantel, a vacinação com três doses da vacina Bilhvax foi segura, foi imunogênica, porém não foi protetora, ou seja, não foi capaz de prevenir a reinfecção nas crianças imunizadas (Riveau *et al.* 2018).

O segundo antígeno a seguir para ensaios clínicos foi a Sm14, uma proteína de ligação a ácidos graxos de *S. mansoni*. Em camundongos, Sm14 recombinante gerou níveis de proteção de ~67% contra o desafio de *S. mansoni*, e proteção completa contra *Fasciola hepática*. O ensaio clínico da vacina formulada com adjuvante glucopiranosil lipídico A (GLA) em uma emulsão óleo-em-água deu início em 2011 no Rio de Janeiro – Brasil. Vinte voluntários do

sexo masculino de uma área não endêmica para esquistossomose foram vacinados com três doses de 50 µg de rSm14 por via intramuscular. Os participantes foram avaliados clinicamente, bioquimicamente e imunologicamente por até 120 dias. O produto apresentou eventos adversos leves, se mostrando seguro e fortemente imunogênico nesse ensaio clínico de Fase 1 (Ricciardi and Ndao 2015, Santini-Oliveira *et al.* 2016, Tebeje, Harvie *et al.* 2016). Com isso, a vacina seguiu para os ensaios clínicos de fase 2 e 3 no Brasil e no Senegal, os quais ainda estão em andamento (Tendler *et al.* 2018).

Por último, a SmTSP-2, uma proteína do grupo das Tetraspaninas, proteínas que são abundantes no tegumento de esquistossomos e são encontradas na membrana mais externa do estágio intra-mamífero do parasita, e, portanto, expostos à interação com o sistema imune do hospedeiro. O antígeno foi capaz de conferir mais de 50% de proteção em camundongos imunizados junto com adjuvante de Freund (Fonseca *et al.*; 2015; Tran *et al.*; 2006). No entanto, quando formulado com outros adjuvantes (Alum+CpG), os níveis de proteção se mostraram inferiores (25 a 27%) (Pearson, Pickering *et al.* 2012, Tebeje, Harvie *et al.* 2016).

Dessa forma, os atuais candidatos apresentam limitações e, portanto, é importante continuar a investigação de novos alvos e novas formulações antigênicas na busca de uma vacina contra esquistossomose (Bergquist, Utzinger *et al.* 2008, Fonseca, Oliveira *et al.* 2015).

#### *1.4.3. Genoma, Transcriptoma e Proteoma do Schistosoma mansoni e a descoberta de novos candidatos vacinais*

Novos antígenos vem sendo desvendados e estudados ao longo dos últimos 15 anos e isso se deve aos avanços da biologia molecular, que permitiu o estudo do genoma, do transcriptoma e do proteoma do tegumento do parasita. A publicação simultânea dos transcriptomas de *S. mansoni* (Verjovski-Almeida, DeMarco *et al.* 2003) e do *S. japonicum* (Hu, Yan *et al.* 2003), possibilitou a busca por genes que codificam proteínas potencialmente expostas na superfície do parasita e/ou secretadas nos estágios que infectam o hospedeiro mamífero, sendo estas as principais características para um candidato vacinal. Os genomas de *S. mansoni* e *S. japonicum* foram sequenciados em 2009 (Berriman *et al.* 2009; Zhou *et al.* 2009), seguido do genoma de *S. haematobium* em 2012 (Ricciardi and Ndao 2015). Em seguida estudos de genômica funcional e vacinologia reversa, permitiram a seleção de candidatos vacinais que após expressão na forma recombinante, foram testados “*in vivo*” com relação a capacidade antigênica e protetora (Farias, Tararam *et al.* 2011, Pinheiro, Martins *et al.* 2011; Farias *et al.* 2010).

Nosso grupo de pesquisa nos últimos 15 anos de trabalho, tem se dedicado a caracterização de moléculas expostas na superfície ou secretadas pelos estágios que infectam o

hospedeiro mamífero (Lopes, Paiva et al. 2009, Rofatto, Tararam et al. 2009, Tararam, Farias et al. 2010, Araujo-Montoya, Rofatto et al. 2011, Farias, Tararam et al. 2011, Farias, Rodrigues et al. 2012, Rofatto, Parker-Manuel et al. 2012, Rofatto, Araujo-Montoya et al. 2013). O resultado destes e de outros trabalhos (Braschi, Borges et al. 2006, Curwen, Ashton et al. 2006, Parker-Manuel, Ivens et al. 2011, Pinheiro, Ribeiro et al. 2014, Ricciardi, Dalton et al. 2015, Ricciardi and Ndao 2015) estabeleceu uma nova visão sobre a composição do tegumento, suas membranas de superfície, e o secretoma do parasita. Dentre esses potenciais alvos identificados na interface parasita hospedeiro, alguns candidatos foram escolhidos para compor o novo sistema de entrega para múltiplos antígenos a ser testado.

#### 1.4.4. Racional para escolha dos antígenos

Os mecanismos imunológicos associados à eliminação do *Schistosoma* são pouco conhecidos. A via de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), é um dos mecanismos já observados, primeiramente em indivíduos residentes em áreas endêmicas para esquistossomose, depois em camundongos imunizados com Sm-p80 (subunidade maior da Calpaína) e GST (Glutathione-S-transferase), onde, IgE, IgG, eosinófilos, monócitos e plaquetas foram associados a aquisição de resistência a infecção. Independentemente dos mecanismos envolvidos, os anticorpos são atores-chave na imunidade protetora induzida pelas vacinas revisado em (Fonseca, Oliveira et al. 2015).

O modelo “golden standard” de vacina contra esquistossomose em camundongos é o de cercária atenuada, na qual o mecanismo indutor de resistência é claramente dependente de linfócitos T CD4+, que secretam IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  promovendo a ativação de macrófagos, os quais secretam espécies reativas de oxigênio/ nitrogênio, que promovem focos inflamatórios e bloqueiam fisicamente o parasita no pulmão (Coulson and Wilson 1988, Fonseca, Oliveira et al. 2015). Evidências mostram que a resposta imune protetora em modelo murino é baseada em múltiplos mecanismos, uma vez que uma dose da vacina polariza a resposta para Th1, múltiplas doses polarizam para Th2 e no caso de camundongos nocautes para IL-10, doses múltiplas formam uma resposta mista Th1/Th2 também protetora (Wynn and Hoffmann, 2000).

Um outro racional a ser explorado é o que vem sendo utilizado no desenvolvimento de uma vacina contra ancilostomose. Neste caso, uma aspártico protease (Na-APR-1) de *Necator americanus* foi produzida em combinação com uma Glutathione-S-transferase (Na-GST-1) e o resultado observado foi a morte do parasita mediada pelo bloqueio da alimentação (Hotez, Bethony et al. 2010). Essas moléculas estão sendo avaliadas em ensaio clínico de fase I no Gabão (Clinical trial number: NCT02839161).

Diante deste contexto, acreditamos que somente um ataque orquestrado contra diferentes antígenos, presentes em diferentes estágios e com funções chave na migração e nutrição dos vermes, possa ter êxito na eliminação do parasita. Com base neste racional, foram selecionadas proteínas que estão presentes em diferentes momentos do processo de invasão do hospedeiro, adicionalmente muitos desses alvos encontram-se no tegumento (Figura 4B), principal interface parasita-hospedeiro, sendo eles:

- SmCD59.2 é uma proteína localizada na superfície do tegumento e regulada positivamente na transição de cercaria para esquistossômulo (Farias, Krautz-Peterson et al. 2013), fato também observado para o ortólogo de *S. japonicum*; foi possível observar ainda que essa proteína é essencial para o desenvolvimento do esquistossômulo, sendo imunogênica no estágio em que a larva atinge o pulmão e encontra-se exposta durante esse período (McWilliam, Driguez et al. 2014). Ortólogos desta proteína foram recentemente propostos como novos alvos vacinais para *Fasciola hepática* e *S. japonicum* (McWilliam, Driguez et al. 2014, Shi, Toet et al. 2014). A imunização com SmCD59.2, na forma de vacina de DNA, promoveu 22% de redução da carga parasitária (Farias, Tararam et al. 2011).

- SmAP (Fosfatase Alcalina) é uma proteína observada na superfície de vermes adultos, mas também amplamente distribuída pelos tecidos e que possui uma tradução muito rápida durante a transformação de cercarias para esquistossômulos. Esta característica sugere seu envolvimento no processo de invasão do hospedeiro (Araujo-Montoya, 2011). Alguns estudos demonstram que o tratamento com o praziquantel e a coadministração de um antissoro que inibe a atividade de fosfatase alcalina aumenta a morte de vermes fêmeas “in vivo” (Fallon, Smith et al. 1994). Estudos mais recentes mostram que o antissoro de macacos Rhesus infectados, modelo de auto-cura para esquistossomose, reconhecem esta proteína. Com base nesses resultados, nosso grupo testou a fosfatase alcalina como antígeno vacinal; a formulação utilizou uma dose subcurativa de Praziquantel aliada à vacina resultando em 41% de redução da carga parasitária (Araujo-Montoya, Rofatto et al. 2011, Rofatto, Araujo-Montoya et al. 2013).

- Anexinas constituem uma família de proteínas que são capazes de se ligar a membranas de fosfolipídios ácidos. O seu modo de ligação a membrana inclui a formação de um complexo ternário que envolve a proteína, os íons de cálcio e a membrana (Leow, Willis et al. 2014). Nosso grupo identificou 11 membros desta família no genoma e realizou a caracterização molecular da Anexina-2 onde a proteína foi localizada no tegumento, sendo altamente regulada na transição de cercarias para esquistossômulos; possui um núcleo conservado com quatro

domínios repetidos e uma região N-terminal variável (Tararam, Farias et al. 2010). Estudos sugerem que ela esteja intimamente associada ao arranjo do tegumento, em processos como: remodelamento de membrana, endocitose/exocitose, fusão de vesículas e regulação do fluxo de íons. Recentemente, uma nova classificação desse grupo de proteínas foi proposta com a descrição de 2 membros adicionais, sendo 3 associados ao tegumento (Cantacessi, Seddon et al. 2013). Um estudo desenvolvido para determinar a abundância das proteínas de tegumento, mostrou que na categoria de proteína associadas às membranas do tegumento, a Anexina-2 é a segunda proteína mais abundante (Tararam, Farias et al. 2010, Castro-Borges, Simpson et al. 2011).

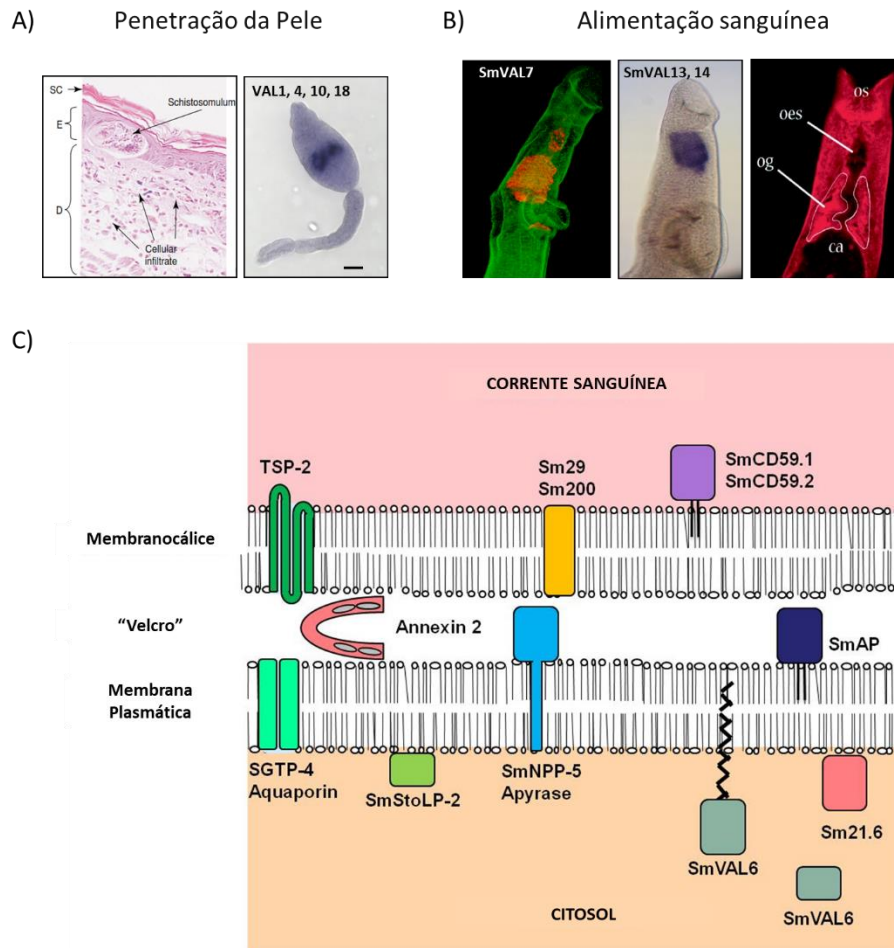
- SmTSP-2, é uma proteína integral de membrana, expressa na superfície, possivelmente envolvida na manutenção da integridade das membranas do tegumento, através de Microdomínios Enriquecidos em TSP (MET). Sabe-se que em *S. mansoni*, algumas das proteínas associadas a METs são fortemente ligadas a membrana plasmática apical, como Anexina-2, Sm29 e Calpaína (Jia, Schulte et al. 2014, Leow, Willis et al. 2014). Estudos com uso de RNA de interferência mostram que esquistossômulos deficientes para esta proteína, apresentam uma porcentagem de maturação em vermes adultos 83% menor que parasitas normais. Em outro estudo, uma vacina de proteína recombinante utilizando adjuvante de Freund foi testada em camundongos, e após a imunização e desafio observou-se redução de 57% da carga parasitária. Sendo assim, SmTSP-2 parece ser um antígeno vacinal promissor contra *S. mansoni* (Tran, Pearson et al. 2006, Jia, Schulte et al. 2014).

- Calpaína é uma cisteína protease neutra, dependente de cálcio, encontrada na superfície do epitélio sincicial e na musculatura subjacente. Foi demonstrada a sua eficácia e capacidade de reduzir o número de ovos (Karmakar, Zhang et al. 2014). A imunização *Prime-boost* (vacina de DNA e reforço com proteína recombinante) com Sm-p80, resultou numa redução na carga parasitária de 49% e 50% de proteção em camundongos. Além disso, uma redução na carga parasitária de 46% em babuínos (*Papio anubis*) foi relatada recentemente com a vacina baseada em Sm-p80 recombinante (Ahmad *et al.* 2010, Zhang *et al.* 2010).

- Sm29 é uma proteína ligada a membrana, que possui uma ancora de GPI, assim ficando ancorada à superfície do tegumento. Seu transcrito possui expressão aumentada na transformação de cercaria para esquistossômulo. A imunização de camundongos com a proteína recombinante resultou numa resposta imune induzida do tipo Th1, levando a 50% de redução do granuloma no fígado, 60% de redução nos ovos do intestino e 51% de redução de

vermes adultos (Cardoso et al. 2008). As condições de re-enovelamento desta proteína já foram estabelecidas (Chura-Chambi, Nakajima et al. 2013).

Além das moléculas de tegumento, uma série de proteínas secretadas durante a invasão do hospedeiro, na penetração da pele e alimentação sanguínea podem ser consideradas alvos potenciais (Figura 4A-B), sendo elas:



**Figura 4: Antígenos identificados em diferentes estágios do parasita.** A - Secção transversal da pele (orelha) de camundongo 48 horas após a penetração do parasita, mostrando um esquistossômulo na epiderme. SC – extrato córneo; E – epiderme e D – derme (extraído e modificado de Mountford & Trottein (2004)); localização dos transcritos SmVAL 4 e 24 nas glândulas pré-acetabulares de cercárias imaturas (Fernandes, Barbosa et al. 2017). B – Glândula esofágica e esôfago anterior mostrando a proteína SmVAL7 (Rofatto et al., 2012) e os transcritos smVAL13 e 14 (Fernandes, Barbosa et al. 2017) possivelmente envolvidas no processo de alimentação sanguínea do parasita. C- Esquema das membranas de superfície do tegumento e os alvos escolhidos com a porcentagem de proteção individual já relatada em trabalhos anteriores (Extraído e modificado de (Gryseels, Polman et al. 2006)).

- SmVAL4 está presente na glândula pré-acetabular de cercárias, atuando na invasão da pele pelo parasita (Fernandes, Barbosa et al. 2017). Recentemente, a partir de uma colaboração estabelecida com o grupo da Dra. Oluwatoyin A. Asojo (Baylor College of Medicine, Houston, USA), a estrutura cristalográfica da proteína SmVAL4 foi resolvida. A proteína recombinante SmVAL4 expressa em *P. pastoris* é capaz de ligar lipídios (colesterol) e complementar o



fenótipo *in vitro* de mutantes de levedura que não possuem a proteína endógena com o mesmo domínio (CAP) (Kelleher, Darwiche et al. 2015).

- SmVAL7 é secretada pelas glândulas esofágicas (Rofatto et al., 2012) e acredita-se que esta proteína esteja envolvida no processo de alimentação sanguínea de vermes adultos. Desta forma, anticorpos neutralizantes direcionados contra esta proteína poderiam interferir neste processo essencial ao desenvolvimento do parasita. Experimentos de imunização já foram realizados com a SmVAL7 recombinante produzida em *E. coli* e a proteína se demonstrou pouco imunogênica, induzindo níveis muito baixos de anticorpos IgG (dados não publicados). O perfil de resposta imune gerada foi misto e após o desafio com cercárias, não apresentou proteção. Talvez seja necessária a utilização de um sistema adjuvante mais potente para a otimização deste antígeno.

- SmVAL18 foi identificada em uma análise da secreções de cercárias (Curwen, Ashton et al. 2006). Esse mesmo grupo, mais tarde, descreveu que esta proteína é glicosilada (Jang-Lee, Curwen et al. 2007), possivelmente atua no processo de penetração da pele e invasão do hospedeiro. Recentemente nosso grupo de pesquisa descreveu a localização desta proteína nas glândulas pré-acetabulares de cercárias (Farias *et al.* 2019) e investigou a interação desta proteína com componentes de matriz extracelular. Foi verificado que a SmVAL18 é uma proteína de ligação ao plasminogênio, que na presença de um ativador de plasminogênio (uPA) aumenta a conversão de PLG-plasmina, o que pode promover a atividade proteolítica local que degrada a matriz extracelular da derme, permitindo assim que os parasitas atinjam a circulação (Fernandes *et al.* 2018).

- Catepsina B1 (SmCB1): Membro da família das C1-peptidases, conhecidas por desempenhar papéis essenciais na digestão de tecidos sanguíneos do hospedeiro e hemoglobina. Considerado um possível alvo vacinal devido a sua função e também por suas propriedades adjuvantes intrínseca, em função da sua atividade proteolítica. Recentemente a SmCB foi produzida na forma recombinante em *Pichia pastoris* e testada como antígeno vacinal em camundongos. Com duas doses da vacina foi possível observar uma redução de 66% na carga parasitária e 51% de redução dos ovos no fígado. Essa mesma vacina ao ser coadministrada com SG3PDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e PRX-MAP (peroxirredoxina múltiplos peptídeos antigênicos), em uma dose, atingiu uma redução de 83% da carga parasitária (Ricciardi, Dalton et al. 2015).

Com antígenos presentes em diferentes momentos do processo de invasão do hospedeiro, acreditamos que a resposta imune induzida seja capaz de bloquear/interferir com a migração

do parasita. Para tanto, necessitamos de uma estrutura eficiente para montagem e apresentação de antígenos como os mencionados acima. A seguir apresentamos uma proposta para esta estrutura.

## **1.5. Modelos de apresentação de antígenos**

### *1.5.1. Estratégias vacinais já adotadas contra esquistossomose*

As vacinas representam a maior contribuição da imunologia para a saúde humana. Devido a isso, muito esforço tem sido empregado no desenvolvimento de tecnologias que possibilitem a criação de novas vacinas contra doenças humanas ainda sem prevenção, como as esquistossomose (Trovato and De Berardinis 2015).

Os esquistossomos não se multiplicam no hospedeiro humano e a maior parte da patologia ocorre como consequência da deposição de ovos nos tecidos do sistema porta-hepático, que levam ao dano do órgão associado à fibrose, inflamação e sangramento. As atuais estratégias de desenvolvimento de vacinas visam prevenir a infecção e / ou reduzir o número de ovos através da interrupção da reprodução do parasita. Assim, entre os principais objetivos da vacina estão os estágios de cercaria, esquistossômulos migratórios e fêmeas adultas (McManus and Loukas 2008, Merrifield, Hotez et al. 2016).

Nesse contexto, encontramos abordagens clássicas da vacinologia, como uma vacina viva e atenuada, que é o caso da vacina de cercaria irradiada, onde as larvas atenuadas não conseguem amadurecer em vermes adultos e não produzem ovos. Essa vacina induz altos níveis de proteção contra reinfecção, possui uma resposta imune mediada por células T, uma vez que é capaz de ativar ambas as vias Th1 e Th2 (McManus and Loukas 2008).

Além dessa abordagem clássica, uma gama de novas abordagens em vacinologia tem sido investigadas como Vacinas recombinantes, Vacinas de DNA e Vacinas de peptídeo sintético.

Dentre as vacinas recombinantes testadas, alguns exemplos são SmTSP-2 e Sm14, que seguiram para ensaios clínicos (Clinical trial number: NCT02337855; e NCT03799510). Apesar de um grande número de antígenos serem testados, até o momento poucos deles apresentaram proteção suficiente frente ao desafio com cercarias. A descoberta de um único antígeno que conferisse um alto nível de proteção contra a esquistossomose seria ideal, por isso, tantos experimentos realizados com um único antígeno. Porém dada a complexidade e magnitude do parasita, essa hipótese parece pouco realista, fato que evidencia a necessidade de utilização de vários antígenos e de melhores formas de apresentação dos mesmos (Egesa, Hoffmann et al. 2017, Wilson, Hong Li et al. 2017).

Uma alternativa foram as vacinas de DNA; devido a sua capacidade de gerarem respostas imunológicas humorais e celulares. Um exemplo de aplicação dessa abordagem é o uso de plasmídeos codificando Sm29, SmTSP-2 ou uma quimera contendo ambos os genes. Neste estudo foi possível observar a capacidade da vacina em gerar uma resposta imune protetora contra a esquistossomose, mas esta ainda precisa ser otimizada, visto que a proteção ainda foi parcial (Goncalves de Assis, Batistoni de Moraes et al. 2015).

O esquistossomo é um organismo complexo, que possui um escudo externo sob a forma de um membranocálice, o qual protege a membrana plasmática do tegumento do parasita adsorvendo componentes do hospedeiro, como o CD44 e assim inibindo a ligação de leucócitos. A gastroderme do parasita também é protegida por hidrolases e enzimas antioxidantes, que são capazes de destruir rapidamente constituintes ingeridos do plasma bem como proteger de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio produzidas por leucócitos. Logo após a penetração através da pele, nos estágios iniciais da infecção e antes de cair na corrente sanguínea, o verme já é capaz de regular ativamente a hipo-responsividade dérmica do hospedeiro, ativando a produção de IL-10 (Wilson, Hong Li et al. 2017).

Sendo assim, é de se esperar que preparações com mais de um antígeno, como a quimera Sm29-TSP-2 sejam melhores que as preparações compostas por um único antígeno, entretanto as preparações já testadas focam apenas na coadministração dos antígenos ou em formulação de quimeras. Ou seja, ainda falta testar um bom sistema apresentador de múltiplos antígenos (Egesa, Hoffmann et al. 2017, Wilson, Hong Li et al. 2017), que são estratégias promissoras na área de vacinologia atualmente.

#### *1.5.2. Modelos de apresentação de múltiplos antígenos*

Um grande obstáculo para o desenvolvimento de vacinas eficazes é projetar sistemas de entrega de antígenos que sejam capazes de otimizar a apresentação do antígeno e induzir amplas respostas imunes protetoras (Trovato and De Berardinis 2015).

Uma grande quantidade de sistemas apresentadores de antígeno surgiu recentemente e têm sido amplamente empregados como veículos para terapia genética e para fins de vacina. Dentre eles encontramos sistemas baseados em vírus, bactérias, vesículas, VLPs (Virus Like Particles) e nanopartículas (Trovato and De Berardinis 2015).

Os sistemas de apresentação baseados em vírus consistem de vírus de baixa replicação, geneticamente modificados e portadores de um cassete de expressão de genes terapêuticos clonados no esqueleto viral. Como exemplo dessa abordagem temos os adenovírus e retrovírus (Trovato and De Berardinis 2015). Em paralelo, seguindo o mesmo conceito, também

encontramos bactérias recombinantes carreadoras, como *Salmonella typhi* e BCG (Bacillus Calmette-Guerin), os quais vão realizar a expressão direta do antígeno heterólogo no hospedeiro vacinado (Spreng, Dietrich et al. 2000).

Os sistemas de apresentação de antígenos nanoparticulados possuem vantagens com relação as vacinas tradicionais devido às suas características físico químicas, como: tamanho, carga da superfície, composição do biomaterial e propriedades imunoestimulatórias. A exposição de antígenos multiméricos na superfície de alguns desses sistemas permitem uma ligação cruzada com receptores de células B, conduzindo para uma melhor resposta mediada por anticorpos. Em outros casos, algumas partículas podem ser designadas a promover a entrega citosólica do antígeno, melhorando a apresentação via MHC de classe I e conduzindo a uma resposta de células T citotóxicas (De Temmerman, Rejman et al. 2011, Daleke-Schermerhorn, Felix et al. 2014, Sahdev, Ochyl et al. 2014).

De maneira geral, esses complexos aumentam a absorção do antígeno, seu processamento e apresentação, oferecem a capacidade de encapsular compostos, prevenindo assim a degradação, aumentando a meia-vida e providenciando uma liberação sustentada do composto. Como exemplo desses sistemas encontramos partículas de PLGA (poli[ácido lático-co-ácido glicólico]), quitosana, lipossomos, virossomos, VLPs e OMVs (Outer Membrane Vesicles) (Daleke-Schermerhorn, Felix et al. 2014, Trovato and De Berardinis 2015).

As vesículas de membrana externa, também conhecidas como OMVs (Outer membrane vesicles), são estruturas produzidas por bactérias Gram-negativas. Essas estruturas esféricas são formadas a partir da própria membrana externa das bactérias Gram-negativas e seu periplasma, associam-se a proteínas solúveis e insolúveis, e desempenham diversas funções biológicas (Kulp and Kuehn 2010).

Essas vesículas podem funcionar como potente adjuvante em vacinas, dada a presença de lipopolissacarídeos (LPS) e proteínas na sua superfície, e também como um importante carreador. As vesículas advindas da bactéria *Neisseria meningitidis* serogrupo B são um exemplo; estudos recentes mostram a propensão em ativar células dendríticas e macrófagos. A presença do LPS juntamente com as proteínas de membrana externa como PorA, induzem a expressão de moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 ou CD40, as quais são essenciais para a produção de anticorpos; também induzem o aumento da secreção de quimiocinas, ativam neutrófilos, células T e células dendríticas imaturas (Kulp and Kuehn 2010, Moshiri, Dashtbani-Roozbehani et al. 2012). Já a proteína PorB, por sua vez, liga-se a TLR-1 e TLR-2, induzindo uma cascata de sinalização que promove a maturação de células dendríticas e o aprimoramento na apresentação dos antígenos (Sanders and Feavers 2011).

As OMVs de *Neisseria lactamica*, uma espécie comensal dessa família, possuem as mesmas propriedades adjuvantes observadas nas OMVs de *N. meningitidis*, entretanto, o fato de não possuir PorA em sua superfície, há uma diminuição na competição antigênica dessa molécula, fato esse que a torna um carreador bem interessante para antígenos heterólogos (Gorringe, Halliwell et al. 2005).

Para viabilizar o uso dessas estruturas em vacinas humanas é necessário um tratamento capaz de eliminar parte do LPS presente na superfície, uma vez que este componente é tóxico. Estudos recentes apontam o uso da extração à base de detergentes como deoxicolato de sódio (DOC), que elimina uma boa porcentagem do LPS presente na molécula (Acevedo *et al.* 2014). A vacina Bexsero®, recém-desenvolvida pela Novartis, é um dos exemplos do uso desta abordagem. Já aprovada para uso em humanos pela FDA (do inglês “Food and Drug Administration”) e EMA (do inglês “European Medicine Agency”), essa vacina utiliza uma combinação de quatro proteínas recombinantes, OMVs e hidróxido de alumínio como adjuvante, o que resultou em uma estrutura estável e viável; aparentemente o hidróxido de alumínio diminuiu a resposta pirogênica em coelhos (Rosenqvist *et al.* 1998; Holst, Martin *et al.* 2009; Acevedo, Fernandez *et al.* 2014). Os testes clínicos necessários à aprovação desta vacina demonstraram que ela não apresentou efeitos adversos sérios ou desencadeou processos alérgicos. O mecanismo efetor observado foi promovido pela ação bactericida de anticorpos produzidos contra as proteínas recombinantes que compõe a vacina.

Com base nesses conhecimentos somados ao interesse de desenvolvimento de uma vacina multi-antígenos contra esquistossomose é que chegamos no modelo apresentador de antígenos proposto neste trabalho. Acreditamos que o desenvolvimento de um sistema de apresentação de múltiplos antígenos para *Schistosoma mansoni*, montado em uma estrutura bem definida, possa ser a solução para a formulação de uma vacina eficaz e com altos índices protetores, mimetizando talvez, desta forma, o padrão de imunogenicidade da vacina de cercaria irradiada.

### 1.5.3. Multiple Antigen Presenting System (MAPS)

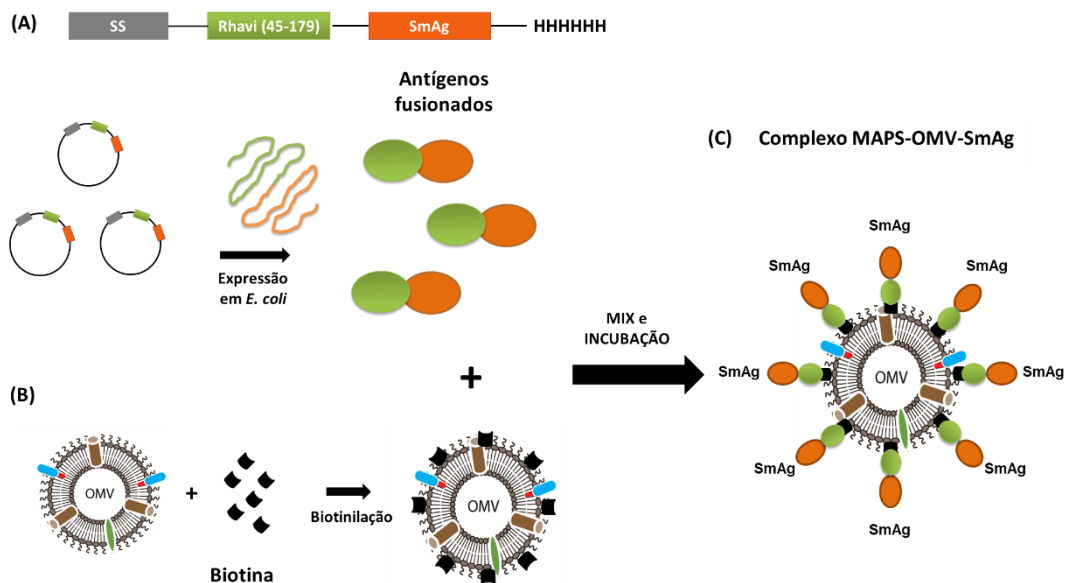
O sistema apresentador de múltiplos antígenos (Multiple antigen-presenting system – MAPS) proposto neste trabalho usa um suporte purificado e proteínas como imunógenos. Estes componentes antigênicos são isolados e posteriormente reagrupados em um complexo macromolecular integrado.

Recentemente Zhang e colaboradores propuseram uma nova abordagem de acoplamento à base de afinidade, onde os antígenos fusionados à rizavidina (Rhavi), uma proteína de ligação à biotina, se ligam a uma matriz polissacarídica biotinilada, formando um complexo

apresentador de múltiplos antígenos que podem ativar a proteção mediada por células B e T, proporcionando a característica de proteção múltipla, como a observada em vacinas de células inteiras (Zhang, Lu et al. 2013).

Por outro lado, Darleke-Schermerhorn e colaboradores em 2014 demonstraram como uma plataforma apresentadora de antígenos baseada em OMVs pode ser usada para alcançar alta exposição de múltiplos antígenos heterólogos e assim assemelhar-se ao processo de infecção natural.

A nossa proposta é inovadora e de elevado potencial adjuvante pois propõe utilizar as OMVs como suporte biotinizado para acoplamento dos múltiplos antígenos. O gene das proteínas alvo geneticamente fundidas ao gene da rizavidina são expressas em *Escherichia coli*, adquirindo a capacidade de ligação à biotina. Desta forma, os antígenos se ligam à matriz de OMVs biotinizadas por afinidade com grande eficiência para formação do complexo (Figura 5).



**Figura 5: Esquema representativo da montagem do complexo MAPS-OMV-SmAg.** (A) Representação do cassete de expressão contendo os antígenos fusionados a proteína Rhavi. Uma sequência sinal de secreção está presente na região N terminal de Rhavi. Cauda de histidina. (B) Biotinilação das OMVs (C) Representação esquemática da produção dos complexos multimoleculares MAPS-OMV-SmAg.

Sendo assim, o desenvolvimento de um sistema de apresentação de múltiplos antígenos para *Schistosoma mansoni*, montado em uma estrutura bem definida com elevado poder adjuvante, poderia induzir uma maior resposta imune para a formulação de uma vacina mais eficaz.

## 6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

O trabalho em questão abordou muitas frentes, como a produção de proteínas recombinantes em fusão com rizavidina, a produção de OMVs de *N. lactamica*, bem como o desenvolvimento de uma nova plataforma de apresentação de múltiplos antígenos para uso em vacinas, visando melhorar a resposta imune induzida por antígenos produzidos de forma recombinante.

Com isso, obtivemos resultados promissores na área de produção de proteínas recombinantes fusionadas com rizavidina, uma vez que, os rendimentos de produção obtidos foram satisfatórios e maiores dos que os já observados na literatura. Com relação a eficiência de ligação a biotina, o rendimento foi elevado, mas pode ainda ser otimizado.

Já com relação a produção das OMVs, muitos foram os pontos otimizados no curso do projeto, como produção em agitador rotativo, métodos de concentração, armazenagem e detoxificação. Essas metodologias podem ser muito úteis em projetos futuros.

Esse trabalho permitiu o desenvolvimento de uma nova tecnologia para apresentação de antígenos, a qual se mostrou viável, levando ao aumento da resposta imune específica induzida pelo antígeno testado. Muitas são as variáveis que ainda podem ser exploradas para este sistema, como o acoplamento de vários antígenos ao mesmo tempo ou a viabilidade do uso deste com antígenos contra outras doenças, além da esquistossomose. Devem ser aprofundados os ensaios de imunização diferenciados para melhor explorar e entender a resposta imune adquirida com esse sistema apresentador de antígeno.

Resta ainda verificar se o tipo de resposta induzida com o uso desse sistema de apresentação de múltiplos antígenos teria a capacidade de induzir uma melhor proteção contra o Schistosoma.

De uma forma geral, o trabalho permitiu estabelecer a plataforma de produção dos complexos MAPS-OMV-SmAg e demonstrar sua elevada imunogenicidade em camundongos *in vitro* e *in vivo* e em células do sistema imune humanas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo, R., S. Fernandez, C. Zayas, A. Acosta, M. E. Sarmiento, V. A. Ferro, E. Rosenqvist, C. Campa, D. Cardoso, L. Garcia and J. L. Perez (2014). "Bacterial outer membrane vesicles and vaccine applications." Front Immunol **5**: 121.
- Ahmad, G., W. Zhang, W. Torben, Z. Noor and A. A. Siddiqui (2010). "Protective effects of Sm-p80 in the presence of resiquimod as an adjuvant against challenge infection with *Schistosoma mansoni* in mice." Int J Infect Dis **14**(9): e781-787.
- Airenne, K.J.; Marjomäki, V.S.; Kulomaa, M.S. (1999). Recombinant avidin and avidin-fusion proteins. Biomol Eng. 31;16(1-4):87-92. PMID: 10796989
- Allen, J. E. and R. M. Maizels "Diversity and dialogue in immunity to helminths." Nat Rev Immunol **11**(6): 375-388.
- Allen, J. E. and R. M. Maizels (2011). "Diversity and dialogue in immunity to helminths." Nat Rev Immunol **11**(6): 375-388.
- Amaral, R. S., P. L. Tauil, D. D. Lima and D. Engels (2006). "An analysis of the impact of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil." Mem Inst Oswaldo Cruz **101 Suppl 1**: 79-85.
- Araujo-Montoya, B. O., H. K. Rofatto, C. A. Tararam, L. P. Farias, K. C. Oliveira, S. Verjovski-Almeida, R. A. Wilson and L. C. Leite (2011). "*Schistosoma mansoni*: molecular characterization of Alkaline Phosphatase and expression patterns across life cycle stages." Exp Parasitol **129**(3): 284-291.
- Araujo-Montoya, B. O. (2011). "Investigação da carboxipeptidase, Esfingomielinase e Fosfatase alcalina de *Schistosoma mansoni* como potenciais antígenos vacinais". 141 f. Tese de doutorado em Biotecnologia - Instituto de ciencias biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Bergquist, N. R. and Colley, D. G. (1998). Schistosomiasis vaccine: research to development. Parasitology Today **14**, 99–104.
- Bergquist, N. R. (2002). "Schistosomiasis: from risk assessment to control." Trends Parasitol **18**(7): 309-314.
- Bergquist, R., J. Utzinger and D. P. McManus (2008). "Trick or treat: the role of vaccines in integrated schistosomiasis control." PLoS Negl Trop Dis **2**(6): e244.
- Berriman M, Haas BJ, LoVerde PT, Wilson RA, Dillon GP, Cerqueira GC, Mashiyama ST, Al-Lazikani B, Andrade LF, Ashton PD, Aslett MA, Bartholomeu DC, Blandin G, Caffrey CR, Coghlan A, Coulson R, Day TA, Delcher A, DeMarco R, Djikeng A, Eyre T, Gamble JA, Ghedin E, Gu Y, Hertz-Fowler C, Hirai H, Hirai Y, Houston R, Ivens A, Johnston DA, Lacerda D, Macedo CD, McVeigh P, Ning Z, Oliveira G, Overington JP, Parkhill J, Perteau M, Pierce RJ, Protasio AV, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Sajid M, Salzberg SL, Stanke M, Tivey AR, White O, Williams DL, Wortman J, Wu W, Zamanian M, Zerlotini A, Fraser-Liggett CM, Barrell BG, El-Sayed NM. (2009) "The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*". Nature. Jul 16;460(7253):352-8. doi: 10.1038/nature08160. PMID: 19606141; PMCID: PMC2756445.
- Bickel, Q. D. (2009). "Radiation-attenuated schistosome vaccination – a brief historical perspective." Parasitology, **136** (12). pp. 1621-32. ISSN 0031-1820 DOI: <https://doi.org/10.1017/S0031182009005848>.
- Boros, D. L. (1989). "Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection." Clin Microbiol Rev **2**(3): 250-269.
- Braschi, S., W. C. Borges and R. A. Wilson (2006). "Proteomic analysis of the schistosome tegument and its surface membranes." Mem Inst Oswaldo Cruz **101 Suppl 1**: 205-212.
- Caulada-Benedetti, Z., Al-Zamel, F., Sher, A. and James, S. (1991). Comparison of Th1- and Th2- associated immune reactivities stimulated by single versus multiple vaccination of mice with irradiated *Schistosoma mansoni* cercariae. Journal of Immunology **146**, 1655–1660.
- Cantacessi, C., J. M. Seddon, T. L. Miller, C. Y. Leow, L. Thomas, L. Mason, C. Willis, G. Walker, A. Loukas, R. B. Gasser, M. K. Jones and A. Hofmann (2013). "A genome-wide analysis of annexins from parasitic organisms and their vectors." Sci Rep **3**: 2893.
- Castro-Borges, W., D. M. Simpson, A. Dowle, R. S. Curwen, J. Thomas-Oates, R. J. Beynon and R. A. Wilson (2011). "Abundance of tegument surface proteins in the human blood fluke *Schistosoma mansoni* determined by QconCAT proteomics." J Proteomics **74**(9): 1519-1533.



- Chan, M. S. and D. A. Bundy (1997). "Modelling the dynamic effects of community chemotherapy on patterns of morbidity due to *Schistosoma mansoni*." Trans R Soc Trop Med Hyg **91**(2): 216-220.
- Center for disease control and prevention - CDC (2017). Schistosomiasis Infection. Retrieved 27/05/2019 from <https://www.cdc.gov/dpdx/schistosomiasis/index.html>
- Chura-Chambi R.M., Cordeiro Y., Malavasi N.V., Lemke L.S., Rodrigues D., Morganti L (2013). " An analysis of the factors that affect the dissociation of inclusion bodies and the refolding of endostatin under high pressure". Process Biochemistry, 48 (2) , pp. 250-259.
- Chura-Chambi, R. M., E. Nakajima, R. R. de Carvalho, P. A. Miyasato, S. C. Oliveira, L. Morganti and E. A. Martins (2013). "Refolding of the recombinant protein Sm29, a step toward the production of the vaccine candidate against schistosomiasis." J Biotechnol **168**(4): 511-519.
- Colley, D. G. and Secor, W. E. (2014). " Immunology of human schistosomiasis". Parasite Immunology. 36(8): 347–357. doi: 10.1111/pim.12087
- Coulson, P. S. (1997). "The radiation-attenuated vaccine against schistosomes in animal models: paradigm for a human vaccine?" Adv Parasitol **39**: 271-336.
- Coulson, P. S. and R. A. Wilson (1988). "Examination of the mechanisms of pulmonary phase resistance to *Schistosoma mansoni* in vaccinated mice." Am J Trop Med Hyg **38**(3): 529-539.
- Curwen, R. S., P. D. Ashton, S. Sundaralingam and R. A. Wilson (2006). "Identification of novel proteases and immunomodulators in the secretions of schistosome cercariae that facilitate host entry." Mol Cell Proteomics **5**(5): 835-844.
- Daleke-Schermerhorn, M. H., T. Felix, Z. Soprova, C. M. Ten Hagen-Jongman, D. Vikstrom, L. Majlessi, J. Beskers, F. Follmann, K. de Punder, N. N. van der Wel, T. Baumgarten, T. V. Pham, S. R. Piersma, C. R. Jimenez, P. van Ulsen, J. W. de Gier, C. Leclerc, W. S. Jong and J. Luirink (2014). "Decoration of outer membrane vesicles with multiple antigens by using an autotransporter approach." Appl Environ Microbiol **80**(18): 5854-5865.
- De Jesus A.R., Silva A., Santana L.B., Magalhães A., de Jesus A.A., de Almeida R.P., Rêgo M.A., Burattini M.N., Pearce E.J., Carvalho E.M." Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. Journal of Infectious Diseases. 1;185(1):98-105.
- De Temmerman, M. L., J. Rejman, J. Demeester, D. J. Irvine, B. Gander and S. C. De Smedt (2011). "Particulate vaccines: on the quest for optimal delivery and immune response." Drug Discov Today **16**(13-14): 569-582.
- Dunne, D.W., Cooke, A. (2005). " A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease". Nature Review Immunology. (5):420-6. doi: 10.1038/nri1601. PMID: 15864275
- Egesa, M., K. F. Hoffmann, C. H. Hokke, M. Yazdanbakhsh and S. Cose (2017). "Rethinking Schistosomiasis Vaccine Development: Synthetic Vesicles." Trends Parasitol.
- Eberl, M., Langermans, J.A., Frost, P.A., Vervenne, R.A., van Dam, G.J., Deelder, A.M., Thomas, A.W., Coulson, P.S., and Wilson, R.A., Cellular and humoral immune responses and protection against schistosomes induced by a radiation-attenuated vaccine in chimpanzees. Infect Immun, 2001. 69(9): 5352-62.
- El Ridi, R. and H. Tallima (2015). "Why the radiation-attenuated cercarial immunization studies failed to guide the road for an effective schistosomiasis vaccine: A review." J Adv Res **6**(3): 255-267.
- Engels, D., L. Chitsulo, A. Montresor and L. Savioli (2002). "The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research." Acta Trop **82**(2): 139-146.
- Fallon, P. G., P. Smith, T. Nicholls, J. Modha and M. J. Doenhoff (1994). "Praziquantel-induced exposure of *Schistosoma mansoni* alkaline phosphatase: drug-antibody synergy which acts preferentially against female worms." Parasite Immunol **16**(10): 529-535.
- Fallon, P. G., R. F. Sturrock, A. C. Niang and M. J. Doenhoff (1995). "Short report: diminished susceptibility to praziquantel in a Senegal isolate of *Schistosoma mansoni*." Am J Trop Med Hyg **53**(1): 61-62.
- Farias LP, Chalmers IW, Perally S, Rofatto HK, Jackson CJ, Brown M, Khouri MI, Barbosa MMF, Hensbergen PJ, Hokke CH, Leite LCC, Hoffmann KF. *Schistosoma mansoni* venom allergen-like proteins: phylogenetic relationships, stage-specific transcription and tissue localization as predictors of immunological cross-reactivity. Int J Parasitol. 2019 Jul;49(8):593-599. doi: 10.1016/j.ijpara.2019.03.003. Epub 2019 May 25. PMID: 31136745; PMCID: PMC6598858.

- Farias, L. P., G. Krautz-Peterson, C. A. Tararam, B. O. Araujo-Montoya, T. R. Fraga, H. K. Rofatto, F. P. Silva-Jr, L. Isaac, A. A. Da'dara, R. A. Wilson, C. B. Shoemaker and L. C. Leite (2013). "On the three-finger protein domain fold and CD59-like proteins in *Schistosoma mansoni*." PLoS Negl Trop Dis **7**(10): e2482.
- Farias, L. P., D. Rodrigues, V. Cunna, H. K. Rofatto, E. L. Faquim-Mauro and L. C. Leite (2012). "*Schistosoma mansoni* venom allergen like proteins present differential allergic responses in a murine model of airway inflammation." PLoS Negl Trop Dis **6**(2): e1510.
- Farias, L. P., C. A. Tararam, P. A. Miyasato, M. Y. Nishiyama, Jr., K. C. Oliveira, T. Kawano, S. Verjovski-Almeida and L. C. Leite (2011). "Screening the *Schistosoma mansoni* transcriptome for genes differentially expressed in the schistosomulum stage in search for vaccine candidates." Parasitol Res **108**(1): 123-135.
- Farias LP, Cardoso FC, Miyasato PA, Montoya BO, Tararam CA, Roffato HK, et al. (2010) "*Schistosoma mansoni* Stomatin Like Protein-2 Is Located in the Tegument and Induces Partial Protection against Challenge Infection." PLoS Negl Trop Dis **4**(2): e597. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000597>.
- Fernandes, R.S., Fernandes, L. G. V., de Godoy, A. S., Miyasato, P.A., Nakano, E., Farias, L.P., Nascimento, A.L.T.O., Leite, L.C.C. (2018). "*Schistosoma mansoni* venom allergen-like protein 18 (SmVAL18) is a plasminogen-binding protein secreted during the early stages of mammalian-host infection." Molecular Biochem Parasitology. 221:23-31. doi: 10.1016/j.molbiopara.2018.02.003. Epub 2018 Feb 22.
- Fernandes, R. S., T. C. Barbosa, M. M. F. Barbosa, P. A. Miyasato, E. Nakano, L. C. C. Leite and L. P. Farias (2017). "Stage and tissue expression patterns of *Schistosoma mansoni* venom allergen-like proteins SmVAL 4, 13, 16 and 24." Parasit Vectors **10**(1): 223.
- Fernandes, R. S. (2016). "Caracterização molecular de proteínas secretadas da família VAL (Venom Allergen-Like Protein) de *Schistosoma mansoni* e avaliação como antígenos vacinais. 113 f. Tese de Doutorado em Biotecnologia - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Fonseca, C. T., S. C. Oliveira and C. C. Alves (2015). "Eliminating Schistosomes through Vaccination: What are the Best Immune Weapons?" Front Immunol **6**: 95.
- Frasch, C.E.; van Alphen, L.; Holst, J.; Poolman, J. T.; Rosenqvist, E. (2001) Outer Membrane Protein Vesicle Vaccines for Meningococcal Disease. In: Pollard A.J., Maiden M.C. (eds) Meningococcal Vaccines. Methods in Molecular Medicine™, vol 66. Humana Press. DOI <https://doi.org/10.1385/1-59259-148-5:81>.
- Goncalves de Assis, N. R., S. Batistoni de Moraes, B. C. Figueiredo, N. D. Ricci, L. A. de Almeida, C. da Silva Pinheiro, P. Martins Vde and S. C. Oliveira (2015). "DNA Vaccine Encoding the Chimeric Form of *Schistosoma mansoni* Sm-TSP2 and Sm29 Confers Partial Protection against Challenge Infection." PLoS One **10**(5): e0125075.
- Gorringe, A., D. Halliwell, M. Matheson, K. Reddin, M. Finney and M. Hudson (2005). "The development of a meningococcal disease vaccine based on *Neisseria lactamica* outer membrane vesicles." Vaccine **23**(17-18): 2210-2213.
- Gryseels, B., K. Polman, J. Clerinx and L. Kestens (2006). "Human schistosomiasis." Lancet **368**(9541): 1106-1118.
- Hermanson, G. T. (2013) Bioconjugate Techniques. Third Edition, chapter 11 - (Strept)avidin–Biotin Systems. Pages 465-505. Elsevier. DOI <https://doi.org/10.1016/C2009-0-64240-9>.
- Hewitson, J. P., P. A. Hamblin and A. P. Mountford (2005). "Immunity induced by the radiation-attenuated schistosome vaccine." Parasite Immunol **27**(7-8): 271-280.
- Holst, J., D. Martin, R. Arnold, C. C. Huergo, P. Oster, J. O'Hallahan and E. Rosenqvist (2009). "Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*." Vaccine **27 Suppl 2**: B3-12.
- Horta MF, Ramalho-Pinto FJ (1984). "Subclasses of rat IgG active in the killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* in vitro and in vivo." Journal of Immunology. Dec;133(6):3326-32.
- Hotez, P. J., J. M. Bethony, D. J. Diemert, M. Pearson and A. Loukas (2010). "Developing vaccines to combat hookworm infection and intestinal schistosomiasis." Nat Rev Microbiol **8**(11): 814-826.
- Hu, W., Q. Yan, D. K. Shen, F. Liu, Z. D. Zhu, H. D. Song, X. R. Xu, Z. J. Wang, Y. P. Rong, L. C. Zeng, J. Wu, X. Zhang, J. J. Wang, X. N. Xu, S. Y. Wang, G. Fu, X. L. Zhang, Z. Q. Wang, P. J. Brindley, D. P. McManus, C. L. Xue, Z. Feng, Z. Chen and Z. G. Han (2003). "Evolutionary and biomedical implications of a *Schistosoma japonicum* complementary DNA resource." Nat Genet **35**(2): 139-147.

- Ismail, M., S. Botros, A. Metwally, S. William, A. Farghally, L. F. Tao, T. A. Day and J. L. Bennett (1999). "Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers." Am J Trop Med Hyg **60**(6): 932-935.
- Jang-Lee, J., R. S. Curwen, P. D. Ashton, B. Tissot, W. Mathieson, M. Panico, A. Dell, R. A. Wilson and S. M. Haslam (2007). "Glycomics analysis of *Schistosoma mansoni* egg and cercarial secretions." Mol Cell Proteomics **6**(9): 1485-1499.
- Jia, B. and Jeon, C.O. (2016). "High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives". Open Biol. **6**: 160196. PMID: 27581654 PMCID: PMC5008019 DOI: 10.1098/rsob.160196
- Jia, X., L. Schulte, A. Loukas, D. Pickering, M. Pearson, M. Mobli, A. Jones, K. J. Rosengren, N. L. Daly, G. N. Gobert, M. K. Jones, D. J. Craik and J. Mulvenna (2014). "Solution structure, membrane interactions, and protein binding partners of the tetraspanin Sm-TSP-2, a vaccine antigen from the human blood fluke *Schistosoma mansoni*." J Biol Chem **289**(10): 7151-7163.
- Kanno, A. I. (2013). "Expressão de antígenos de *Schistosoma mansoni* em BCG recombinante". 136 f. Tese de Doutorado em Biotecnologia - Instituto de ciências biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Karmakar, S., W. Zhang, G. Ahmad, W. Torben, M. U. Alam, L. Le, R. T. Damian, R. F. Wolf, G. L. White, D. W. Carey, D. Carter, S. G. Reed and A. A. Siddiqui (2014). "Use of an Sm-p80-based therapeutic vaccine to kill established adult schistosome parasites in chronically infected baboons." J Infect Dis **209**(12): 1929-1940.
- Katz, N. (1999). "[Problems in the development of a vaccine against schistosomiasis mansoni]." Rev Soc Bras Med Trop **32**(6): 705-711.
- Kelleher, A., R. Darwiche, W. C. Rezende, L. P. Farias, L. C. Leite, R. Schneiter and O. A. Asojo (2015). "*Schistosoma mansoni* venom allergen-like protein 4 (SmVAL4) is a novel lipid-binding SCP/TAPS protein that lacks the prototypical CAP motifs. Corrigendum." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **71**(Pt 4): 1022.
- Kuwana M., Matsuura E., Kobayashi K., Okazaki Y., Kaburaki J., Ikeda Y. and Kawakami Y (2005). Binding of beta 2-glycoprotein I to anionic phospholipids facilitates processing and presentation of a cryptic epitope that activates pathogenic autoreactive T cells. Blood **105**(4):1552-7. PMID: 15486070 DOI: 10.1182/blood-2004-08-3145.
- Kulp, A. and M. J. Kuehn (2010). "Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles." Annu Rev Microbiol **64**: 163-184.
- Laitinen, O.H.; Hytönen, V.P.; Nordlund, H.R.; Kulomaa, M.S. (2006). " Genetically engineered avidins and streptavidins". Cell Molecular Life Science. **63**(24):2992-3017. PMID: 17086379 DOI: 10.1007/s00018-006-6288-z
- Leow, C. Y., C. Willis, A. Hofmann and M. K. Jones (2014). "Structure-function analysis of apical membrane-associated molecules of the tegument of schistosome parasites of humans: prospects for identification of novel targets for parasite control." Br J Pharmacol.
- Li, X.H., Xu, Y.X., Vance, G., Wang, Y., Lv, L.B., van Dam, G.J., Cao, J.P., Wilson, R.A. (2015). Evidence That *Rhesus* Macaques Self-Cure from a *Schistosoma japonicum* Infection by Disrupting Worm Esophageal Function: A New Route to an Effective Vaccine? PLoS Negl. Trop. Diseases. **9**(7):e0003925. doi: 10.1371/journal.pntd.0003925.
- Liu, J.L.; Zabetakis, D.; Walper, S.A.; Goldman, E.R.; Anderson, G.P.(2014)." Bioconjugates of rhizavidin with single domain antibodies as bifunctional immunoreagents". J. Immunol Methods. **411**:37-42. doi: 10.1016/j.jim.2014.06.004. PMID: 24946086.
- Lopes, D. O., L. F. Paiva, M. A. Martins, F. C. Cardoso, M. A. Rajao, J. M. Pinho, M. V. Caliar, R. Correa-Oliveira, S. M. Mello, L. C. Leite and S. C. Oliveira (2009). "Sm21.6 a novel EF-hand family protein member located on the surface of *Schistosoma mansoni* adult worm that failed to induce protection against challenge infection but reduced liver pathology." Vaccine **27**(31): 4127-4135.
- Maizels, R. M., J. P. Hewitson and K. A. Smith (2012). "Susceptibility and immunity to helminth parasites." Curr Opin Immunol **24**(4): 459-466.
- McManus, D. P. and A. Loukas (2008). "Current status of vaccines for schistosomiasis." Clin Microbiol Rev **21**(1): 225-242.

- McWilliam, H. E., P. Driguez, D. Piedrafita, D. P. McManus and E. N. Meeusen (2014). "Discovery of novel *Schistosoma japonicum* antigens using a targeted protein microarray approach." Parasit Vectors **7**: 290.
- Melman, S. D., M. L. Steinauer, C. Cunningham, L. S. Kubatko, I. N. Mwangi, N. B. Wynn, M. W. Mutuku, D. M. Karanja, D. G. Colley, C. L. Black, W. E. Secor, G. M. Mkoji and E. S. Loker (2009). "Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*." PLoS Negl Trop Dis **3**(8): e504.
- Merrifield, M., P. J. Hotez, C. M. Beaumier, P. Gillespie, U. Strych, T. Hayward and M. E. Bottazzi (2016). "Advancing a vaccine to prevent human schistosomiasis." Vaccine **34**(26): 2988-2991.
- Ministério-da-saúde. (2016). "Situação Epidemiológica - Dados." Retrieved 08/10/2017, 2017, from <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/656-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/esquistossomose/11244-situacao-epidemiologica-dados>.
- Morel, C. M. (2000). "Reaching maturity - 25 years of the TDR." Parasitol Today **16**(12): 522-528.
- Moshiri, A., A. Dashtbani-Roozbehani, S. Najar Peerayeh and S. D. Siadat (2012). "Outer membrane vesicle: a macromolecule with multifunctional activity." Hum Vaccin Immunother **8**(7): 953-955.
- Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) (2017). Relatório da OMS informa progressos sem precedentes contra doenças tropicais negligenciadas. Retrieved 25-05-2019 from [https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5401:relatorio-da-oms-informa-progressos-sem-precedentes-contra-doencas-tropicais-negligenciadas&Itemid=812](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5401:relatorio-da-oms-informa-progressos-sem-precedentes-contra-doencas-tropicais-negligenciadas&Itemid=812)
- Parker-Manuel, S. J., A. C. Ivens, G. P. Dillon and R. A. Wilson (2011). "Gene expression patterns in larval *Schistosoma mansoni* associated with infection of the mammalian host." PLoS Negl Trop Dis **5**(8): e1274.
- Pearce E.J., MacDonald A.S. (2002). "The immunobiology of schistosomiasis." Nature Review Immunology; **2**(7):499-511.
- Pearson, M. S., D. A. Pickering, H. J. McSorley, J. M. Bethony, L. Tribolet, A. M. Dougall, P. J. Hotez and A. Loukas (2012). "Enhanced protective efficacy of a chimeric form of the schistosomiasis vaccine antigen Sm-TSP-2." PLoS Negl Trop Dis **6**(3): e1564.
- Pemberton, R. M., Smythies, L. E., Mountford, A. P. and Wilson, R. A. (1991). Patterns of cytokine production and proliferation by T lymphocytes differ in mice vaccinated or infected with *Schistosoma mansoni*. Immunology **73**, 327–333.
- Pinheiro, C. S., V. P. Martins, N. R. Assis, B. C. Figueiredo, S. B. Morais, V. Azevedo and S. C. Oliveira (2011). "Computational vaccinology: an important strategy to discover new potential *S. mansoni* vaccine candidates." J Biomed Biotechnol **2011**: 503068.
- Pinheiro, C. S., A. P. Ribeiro, F. C. Cardoso, V. P. Martins, B. C. Figueiredo, N. R. Assis, S. B. Morais, M. V. Caliari, A. Loukas and S. C. Oliveira (2014). "A multivalent chimeric vaccine composed of *Schistosoma mansoni* SmTSP-2 and Sm29 was able to induce protection against infection in mice." Parasite Immunol **36**(7): 303-312.
- Ribeiro-dos-Santos, G., S. Verjovski-Almeida and L. C. Leite (2006). "Schistosomiasis--a century searching for chemotherapeutic drugs." Parasitol Res **99**(5): 505-521.
- Ricciardi, A., J. P. Dalton and M. Ndao (2015). "Evaluation of the immune response and protective efficacy of *Schistosoma mansoni* Cathepsin B in mice using CpG dinucleotides as adjuvant." Vaccine **33**(2): 346-353.
- Ricciardi, A. and M. Ndao (2015). "Still hope for schistosomiasis vaccine." Hum Vaccin Immunother **11**(10): 2504-2508.
- Rieckmann, K.H. (1990) Human immunization with attenuated sporozoites. Bull World Health Organ. **68** Suppl: 13-6.
- Riveau G, Schacht A-M, Dompnier J-P, Deplanque D, Seck M, Waucquier N, et al. (2018) Safety and efficacy of the rSh28GST urinary schistosomiasis vaccine: A phase 3 randomized, controlled trial in Senegalese children. PLoS Negl Trop Dis **12**(12): e0006968. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006968>
- Rofatto, H. K., B. O. Araujo-Montoya, P. A. Miyasato, J. Levano-Garcia, D. Rodriguez, E. Nakano, S. Verjovski-Almeida, L. P. Farias and L. C. Leite (2013). "Immunization with tegument nucleotidases associated with a subcurative praziquantel treatment reduces worm burden following *Schistosoma mansoni* challenge." PeerJ **1**: e58.

- Roffato, H. K. (2013). "Caracterização molecular das nucleotídeo pirofosfatase/ fosfodiesterases de *Schistosoma mansoni* e investigação como antígenos vacinais". 248 f. Tese de Doutorado em Biotecnologia - Instituto de ciências biomédicas- Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Rofatto, H. K., S. J. Parker-Manuel, T. C. Barbosa, C. A. Tararam, R. Alan Wilson, L. C. Leite and L. P. Farias (2012). "Tissue expression patterns of *Schistosoma mansoni* Venom Allergen-Like proteins 6 and 7." Int J Parasitol **42**(7): 613-620.
- Rofatto, H. K., C. A. Tararam, W. C. Borges, R. A. Wilson, L. C. Leite and L. P. Farias (2009). "Characterization of phosphodiesterase-5 as a surface protein in the tegument of *Schistosoma mansoni*." Mol Biochem Parasitol **166**(1): 32-41.
- Rosenqvist E., Høyby E.A., Bjune G., Aase A., Halstensen A., Lehmann A.K., Paulssen J., Holst J., Michaelsen T.E., Nøkleby H., Frøholm L.O., Closs O. (1998) Effect of aluminium hydroxide and meningococcal serogroup C capsular polysaccharide on the immunogenicity and reactogenicity of a group B Neisseria meningitidis outer membrane vesicle vaccine. Dev Biol Stand. 92:323-33. PMID: 9554288
- Sabah, A. A., C. Fletcher, G. Webbe and M. J. Doenhoff (1986). "*Schistosoma mansoni*: chemotherapy of infections of different ages." Exp Parasitol **61**(3): 294-303.
- Sahdev, P., L. J. Ochyl and J. J. Moon (2014). "Biomaterials for nanoparticle vaccine delivery systems." Pharm Res **31**(10): 2563-2582.
- Sanders, H. and I. M. Feavers (2011). "Adjuvant properties of meningococcal outer membrane vesicles and the use of adjuvants in Neisseria meningitidis protein vaccines." Expert Rev Vaccines **10**(3): 323-334.
- Santini-Oliveira M., Coler R.N., Parra J., Veloso V., Jayashankar L., Pinto P.M., Ciol M.A., Bergquist R., Reed S.G., Tendler M.(2016) Schistosomiasis vaccine candidate Sm14/GLA-SE: Phase 1 safety and immunogenicity clinical trial in healthy, male adults. Vaccine. 34(4):586-594. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.10.027.
- Scholte, R. G. C., Gosoniua, L., Malone, J. B., Chammartin, F., Utzinger, J., Vounatsou, P. (2014). Predictive risk mapping of schistosomiasis in Brazil using Bayesian geostatistical models. Acta Tropica. V. 132, p. 57-63.
- Shi, Y., H. Toet, V. Rathinasamy, N. D. Young, R. B. Gasser, T. Beddoe, W. Huang and T. W. Spithill (2014). "First insight into CD59-like molecules of adult *Fasciola hepatica*." Exp Parasitol **144**: 57-64.
- Spreng, S., G. Dietrich, S. Niewiesk, V. ter Meulen, I. Gentshev and W. Goebel (2000). "Novel bacterial systems for the delivery of recombinant protein or DNA." FEMS Immunol Med Microbiol **27**(4): 299-304.
- Tararam, C. A. (2011). " Investigação de genes diferencialmente expressos em estágios intra-hospedeiro de *Schistosoma mansoni* como candidatos vacinais". 147 f. Tese de Doutorado em Biotecnologia - Instituto de ciencias biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Tararam, C. A., L. P. Farias, R. A. Wilson and L. C. Leite (2010). "*Schistosoma mansoni* Annexin 2: molecular characterization and immunolocalization." Exp Parasitol **126**(2): 146-155.
- Tebeje, B. M., M. Harvie, H. You, A. Loukas and D. P. McManus (2016). "Schistosomiasis vaccines: where do we stand?" Parasit Vectors **9**(1): 528.
- Tendler M., Almeida M.S., Vilar M.M., Pinto P.M., Limaverde-Sousa G. (2018) Current Status of the Sm14/GLA-SE Schistosomiasis Vaccine: Overcoming Barriers and Paradigms towards the First Anti-Parasitic Human(itarian) Vaccine. Tropical Medical Infection Disease. 3(4). pii: E121. doi: 10.3390/tropicalmed3040121.
- Tran, M. H., M. S. Pearson, J. M. Bethony, D. J. Smyth, M. K. Jones, M. Duke, T. A. Don, D. P. McManus, R. Correa-Oliveira and A. Loukas (2006). "Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis." Nat Med **12**(7): 835-840.
- Trovato, M. and P. De Berardinis (2015). "Novel antigen delivery systems." World J Virol **4**(3): 156-168.
- van der Werf, M. J., S. J. de Vlas, S. Brooker, C. W. Looman, N. J. Nagelkerke, J. D. Habbema and D. Engels (2003). "Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa." Acta Trop **86**(2-3): 125-139.
- Verjovski-Almeida, S., R. DeMarco, E. A. Martins, P. E. Guimaraes, E. P. Ojopi, A. C. Paquola, J. P. Piazza, M. Y. Nishiyama, Jr., J. P. Kitajima, R. E. Adamson, P. D. Ashton, M. F. Bonaldo, P. S. Coulson, G. P. Dillon, L. P. Farias, S. P. Gregorio, P. L. Ho, R. A. Leite, L. C. Malaquias, R. C. Marques, P. A. Miyasato, A. L. Nascimento, F. P. Ohlweiler, E. M. Reis, M. A. Ribeiro, R. G. Sa, G. C. Stukart, M. B. Soares, C. Gargioni, T. Kawano, V. Rodrigues, A. M. Madeira, R. A. Wilson, C. F. Menck, J. C. Setubal, L. C. Leite and E. Dias-Neto (2003). "Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*." Nat Genet **35**(2): 148-157.

Verjovski-Almeida S, Leite LC, Dias-Neto E, Menck CF & Wilson RA (2004). Schistosome transcriptome: insights and perspectives for functional genomics. Trends Parasitology ; 20: 304–308.

World health organization (WHO) (2014). Schistosomiasis - Epidemiological situation. Retrieved 27-05-2019 from <https://www.who.int/schistosomiasis/epidemiology/en/>

WHO. (2016). "Epidemiological situation." Retrieved 08/10, 2017, from <http://www.who.int/schistosomiasis/epidemiology/en/>.

Wilson RA, Coulson PS, Betts C, Dowling MA, Smythies LE (1996)." Impaired immunity and altered pulmonary responses in mice with a disrupted interferon-gamma receptor gene exposed to the irradiated *Schistosoma mansoni* vaccine." Immunology. 1996 Feb;87(2):275-82.

Wilson, R. A. and P. S. Coulson (1999). "Strategies for a schistosome vaccine: can we manipulate the immune response effectively?" Microbes Infect **1**(7): 535-543.

Wilson, R. A., J. A. Langermans, G. J. van Dam, R. A. Vervenne, S. L. Hall, W. C. Borges, G. P. Dillon, A. W. Thomas and P. S. Coulson (2008). "Elimination of *Schistosoma mansoni* Adult Worms by Rhesus Macaques: Basis for a Therapeutic Vaccine?" PLoS Negl Trop Dis **2**(9): e290.

Wilson, R. A., X. Hong Li and W. Castro-Borges (2017). "Schistosome vaccines: problems, pitfalls and prospects." Emerging Topics in Life Sciences **1**(6): 641–650.

Wynn, T.A. and Hoffmann, K. F. (2000). "Defining a schistosomiasis vaccination strategy - is it really Th1 versus Th2?" Parasitology Today. 16(11):497-501. PMID: 11063861.

Yi, J. S., Cox, M. A., & Zajac, A. J. (2010). "T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion." Immunology, 129(4), 474–481. doi:10.1111/j.1365-2567.2010.03255.x

Zhang, F., Y. J. Lu and R. Malley (2013). "Multiple antigen-presenting system (MAPS) to induce comprehensive B- and T-cell immunity." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(33): 13564-13569.

Zhang, W., G. Ahmad, W. Torben, Z. Noor, L. Le, R. T. Damian, R. F. Wolf, G. L. White, M. Chavez-Suarez, R. B. Podesta, R. C. Kennedy and A. A. Siddiqui (2010). "Sm-p80-based DNA vaccine provides baboons with levels of protection against *Schistosoma mansoni* infection comparable to those achieved by the irradiated cercarial vaccine." J Infect Dis **201**(7): 1105-1112.

Zhou, Y., Zheng,H., Chen, X., Zhang, L., Wang, K., Guo, K., Huang, Z., Zhang, B., Huang, W., Jin, K., Tonghai, D., Hasegawa, M., Wang, L., Zhang, Y., Zhou, J., Tao, L., Cao, Z., Li, Y., Vinar, T., Brejova, B., Brown, D., Li, M., Miller, D. J., Blair, D., Zhong, Y., Chen, Z., Liu, F., Hu, W., Wang, Z., Zhang, K., Song, H., Chen, S., Xu, X., Xu, B., Ju, Z., Cheng, Y., Brindley, P. J., McManus, D. P., Feng, Z., Han, Z., Lu, Z., Ren, S., Wang, Y., Gu, W., Kang, H., Chen, J., Chen, X., Chen, S., Wang, L. Yan, J., Wang, B., Lv, X., Jin, L., Wang, B., Pu, S., Zhang, X., Zhang, W., Hu, Q., Zhu, G., Wang, J., Yu, J., Wang, J., Yang, H., Ning, Z., Beriman, M., Wei, C., Ruan, Y., Zhao, G. and Wang, S.(2009) *Schistosoma japonicum* Genome Sequencing and Functional Analysis Consortium. The *Schistosoma japonicum* genome reveals features of host-parasite interplay. Nature. 460(7253):345-51. doi: 10.1038/nature08140. PMID: 19606140; PMCID: PMC3747554.